

Proposta para estágio de Mestrado

Supervisor: Ana Sofia Coroadinha

Contacto Supervisor: avalete@itqb.unl.pt

Lab/Instituição: Cell Line Development and Molecular Biotechnology, UTCA, iBET and ITQB NOVA
Av. da República (EAN), 2781-901 Oeiras. Web: <http://tca.itqb.unl.pt>

TÍTULO: Engenharia genética de linhas celulares humanas para o melhoramento da produção de vectores virais para terapia génica

INTRODUÇÃO

A terapia génica é uma das terapias emergentes do século XXI com maior potencial para o tratamento de doenças infecciosas, cancro e doenças monogénicas. Os vectores virais são os veículos mais utilizados (70%) em terapia génica uma vez que permitem uma entrega eficiente do material genético nas células alvo. Porém, a sua produção em larga escala em quantidade e qualidade relevante é ainda difícil.

Uma das abordagens para melhorar a produção de vectores virais consiste na manipulação genética das linhas celulares que são utilizadas para os produzir. A engenharia genética de células produtoras de vírus já demonstrou a sua utilidade no melhoramento dos títulos virais (quantidade), da qualidade da partículas virais produzidas e também como ferramenta para alterar as células produtoras e conferir-lhes características necessárias à produção em escala industrial. Em trabalho prévio identificámos genes celulares nas células produtoras para a serem alvo de manipulação genética e melhorar a produção de vectores virais. A próxima etapa é manipular estes genes candidatos utilizando tecnologia de DNA recombinante.

OBJECTIVO

Este projecto tem como objectivo o melhoramento da produção de vectores virais – em particular os retrovírus e lentivírus, amplamente utilizados em ensaios clínicos de terapia génica – através da manipulação genética das linhas celulares produtoras. A manipulação será levada a cabo quer em linhas celulares modelo quer em linhas celulares produtoras de vectores virais terapêuticos usados em imunoterapia de cancro.

DESCRIÇÃO DO PROJECTO

Células humanas produtoras de retrovírus e lentivírus serão manipuladas com genes previamente identificados tendo em vista o aumento do título e da qualidade viral e a obtenção fenótipos celulares superiores para a produção em larga escala.

Os genes alvo de manipulação pertencem às vias biológicas de processamento de proteínas no retículo endoplasmático e stress oxidativo. As linhas celulares manipuladas serão analisadas em termos da pro-

(descrição o projecto, continuação)

dução viral (partículas infecciosas e partículas totais) e caracterizadas bioquimicamente para o fenótipo desejado.

Tarefa 1 – Aprendizagem de técnicas de cultura de células animais: trabalhar em condições de esterilidade numa câmara de fluxo laminar, propagação de células, contagem de células, congelamento de células. Leitura de bibliografia.

Tarefa 2 – Aprendizagem de técnicas de biologia molecular: produção de plasmídeos. Clonagem dos genes alvo. Metodologias: transfecção de células animais, análise de células por citometria de fluxo, RT-qPCR.

Tarefa 3 – Aprendizagem de técnicas para a manipulação de vírus recombinantes: cultura de células produtoras, produção de retrovírus e lentivírus; quantificação de partículas infecciosas e de partículas totais; caracterização do crescimento celular e produção viral. Métodos: citometria de fluxo, RT-qPCR; Nanosight.

Tarefa 4 – Manipulação genética de células produtoras. Métodos: transfecção de células animais, transdução de células animais; selecção de células animais, análise dos mutantes.

Tarefa 5 – Caracterização das células manipuladas. Fisiologia e metabolismo celular; análise e comparação de produções virais. Métodos: genómica funcional e metabolómica.

Tese – Escrita da tese de mestrado.

Bibliografia recomendada: Rodrigues AF, Carrondo MJT, Alves PM, Coroadinha AS, *Cellular targets for improved manufacturing of virus-based-biopharmaceuticals*. **Trends Biotech.** 2014 Dec 32(12):602-607 (doi: 10.1016/j.tibtech.2014.09.010).

PLANEAMENTO

	Mês 1	Mês 2	Mês 3	Mês 4	Mês 5	Mês 6	Mês 7	Mês 8	Mês 9	Mês 10	Mês 11	Mês 12
Tarefa 1												
Tarefa 2												
Tarefa 3												
Tarefa 4												
Tarefa 5												
Tese												